

SEPARATION REPORT

抗体分析用 SEC カラム TSKgel SuperSW mAb および TSKgel UltraSW Aggregate について

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel SuperSW mAb および TSKgel UltraSW Aggregate の基本特性	1
2-1. 充てん剤の特長	1
2-2. 校正曲線と分離性能	2
2-3. 溶離液の塩濃度の影響	4
2-4. 測定流速の影響	5
2-5. 市販 SEC カラムとの比較	7
2-6. 耐久性	8
3. 分離例	10
3-1. パパイン消化 IgG の分離	10
3-2. 抗体医薬品の高速度分析	11
3-3. 抗体医薬品の精密分析	12
3-4. 抗体の熱処理生成凝集体の分析	13
4. おわりに	13

1. はじめに

モノクローナル抗体は、標的分子に対して高い結合特異性を有していることから、医薬品として高い治療効果と副作用の軽減が期待され、近年多くの製薬企業において開発が進められています。現在開発・実用化されている抗体医薬品の原薬として使用されるIgGは、製造工程や保存中に二量体や凝集体を形成する場合がありますことが知られており、副作用を引き起こすリスクが懸念されています。このような観点から、IgG製剤の品質を管理する上で、単量体、二量体および凝集体の定量評価は不可欠となっています。

今回、単量体および二量体の分離を主目的とした抗体用SEC (Size-exclusion chromatography; サイズ排除クロマトグラフィー) カラムと、凝集体の分離を主目的とした凝集体用SECカラムを商品化しました。

本報告では、抗体用SECカラムであるTSKgel SuperSW mAb HRおよび TSKgel SuperSW mAb HTPと凝集体用SECカラムの TSKgel UltraSW Aggregateの特性と分離例について紹介いたします。

2. TSKgel SuperSW mAbおよびTSKgel UltraSW Aggregateの基本特性

2-1. 充てん剤の特長

表-1にTSKgel SuperSW mAbおよびTSKgel UltraSW Aggregateのカラム特性および抗体の分離に頻用されている既存カラムTSKgel G3000SW_{XL}との比較を示します。TSKgel SuperSW mAbは、細孔径25 nmのシリカゲル表面にジオール基を導入した粒子径4 μmの充てん剤を充てんしたカラムです。既存の粒子径5 μmのTSKgel G3000SW_{XL}に比べ高い分離能を示し、抗体の二量体と単量体の分離に適しています。一方、TSKgel UltraSW Aggregateは、30 nmの細孔径を有したシリカゲル表面にジオール基を導入した粒子径3 μmの充てん剤を充てんしたカラムで、分子量 (分子サイズ) の大きい、抗体の凝集体の分離に適しています。表-2に今回上市したTSKgel SuperSW mAbシリーズおよびTSKgel UltraSW Aggregateの製品一覧を示します。

表-1 カラム特性

TSKgel	SuperSW mAb HR	SuperSW mAb HTP	UltraSW Aggregate	G3000SW _{XL}
カラムサイズ	7.8 mm I.D.×30 cm	4.6 mm I.D.×15 cm	7.8 mm I.D.×30 cm	7.8 mm I.D.×30 cm
ベース基材	シリカゲル		シリカゲル	シリカゲル
官能基	ジオール基		ジオール基	ジオール基
粒子径	4 μm		3 μm	5 μm
細孔径	25 nm		30 nm	25 nm
排除限界分子量(球状タンパク質)	8.0×10 ⁵ Da		2.5×10 ⁶ Da ^{*)}	8.0×10 ⁵ Da
分子量測定範囲(球状タンパク質)	10 ⁴ ~5×10 ⁵ Da		10 ⁴ ~1.5×10 ⁶ Da	10 ⁴ ~5×10 ⁵ Da
用途	抗体二量体/単量体/分解物の精密分析	抗体二量体/単量体の高速分析	抗体凝集体の精密分析	タンパク質の分離

*) 推定値

表-2 製品一覧

分析カラム

品番	品名	カラムサイズ (mm I.D.×cm)	理論段数	非対称係数
0022854	TSKgel SuperSW mAb HR	7.8×30	≥ 30,000	1.2-1.8
0022855	TSKgel SuperSW mAb HTP	4.6×15	≥ 15,000	0.8-1.4
0022856	TSKgel UltraSW Aggregate	7.8×30	≥ 35,000	1.2-1.8

ガードカラム

品番	品名	カラムサイズ (mm I.D.×cm)	対応する分析カラム (品番)
0022857	TSKgel guardcolumn SuperSW mAb	6.0×4	0022854
0022858	TSKgel guardcolumn SuperSW mAb	3.0×2	0022855
0022859	TSKgel guardcolumn UltraSW	6.0×4	0022856

2-2. 較正曲線と分離性能

TSKgel SuperSW mAb HR, TSKgel SuperSW mAb HTP, TSKgel UltraSW AggregateおよびTSKgel G3000 SW_{XL}を用いた標準タンパク質のクロマトグラムを**図1**に示します。同じ細孔径を有するTSKgel SuperSW mAb HRとTSKgel G3000SW_{XL}は、チログロブリンの二量体および凝集体が細孔内に浸透できずに排除され、排除体積 (V_0) に溶出しています。

一方、細孔径の大きいTSKgel UltraSW Aggregateでは、チログロブリンの二量体は細孔内に浸透し保持されて V_0 よりも遅れて溶出しています。**図2**にチログロブリンのクロマトグラムの比較を示します。TSKgel UltraSW Aggregateでは、チログロブリンの凝集体、二量体および単量体が分離されています。このように、分子量500,000以上のタンパク質では、細孔内に浸透す

ることができる大きな細孔を有したTSKgel UltraSW Aggregateが優れていると言えます。

標準タンパク質を用いた較正曲線を**図3**に示します。分子量10,000~500,000の範囲では、TSKgel SuperSW mAb HRが、TSKgel UltraSW Aggregateに比べ較正曲線の傾きが緩やかであり、より良好な分離が得られることが示唆されます。

図4に各カラムによる市販分子量マーカーのクロマトグラム、**表-3**に各ピークの分離能(分離度:Rs)を示します。測定したタンパク質の分子量範囲では、較正曲線の傾きが緩やかなTSKgel SuperSW mAb HRでTSKgel UltraSW Aggregateに比べ高い分離能が得られています。また、較正曲線の傾きが同じTSKgel G3000SW_{XL}との比較では、粒子径の小さいTSKgel SuperSW mAb HRで分離能が約1.3倍向上しています。

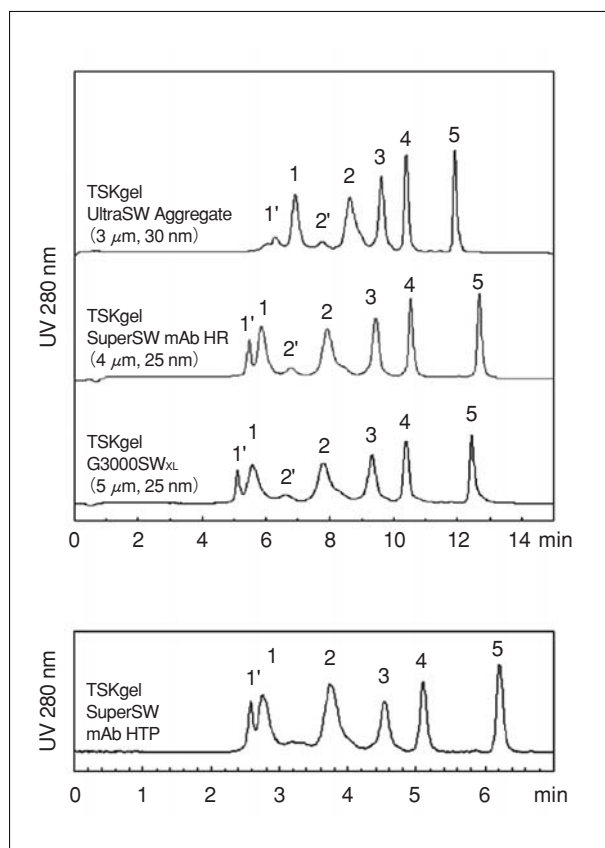


図1：標準タンパク質のクロマトグラム

〈測定条件〉

- カラム：A. TSKgel UltraSW Aggregate
 B. TSKgel SuperSW mAb HR
 C. TSKgel G3000SW_{XL}
 D. TSKgel SuperSW mAb HTP

カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm (A, B, C)
 : 4.6 mm I.D.×15 cm (D)

溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃

流速：1.0 mL/min (A, B, C), 0.35 mL/min (D)

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：10 μL (A, B, C), 5 μL (D)

- 試料：1. チログロブリン (MW 640,000)
 (0.5 g/L ; A, B, C, 2.0 g/L ; D)
 (1'. チログロブリン二量体および凝集体)
 2. γ -グロブリン (MW 155,000)
 (1.0 g/L ; A, B, C, 1.5 g/L ; D)
 (2'. γ -グロブリン二量体)
 3. オブアルブミン (MW 47,000)
 (1.0 g/L ; A, B, C, 1.5 g/L ; D)
 4. リボヌクレアーゼ A (MW 13,700) (1.5 g/L)
 5. p-アミノ安息香酸 (MW 137) (0.01 g/L)

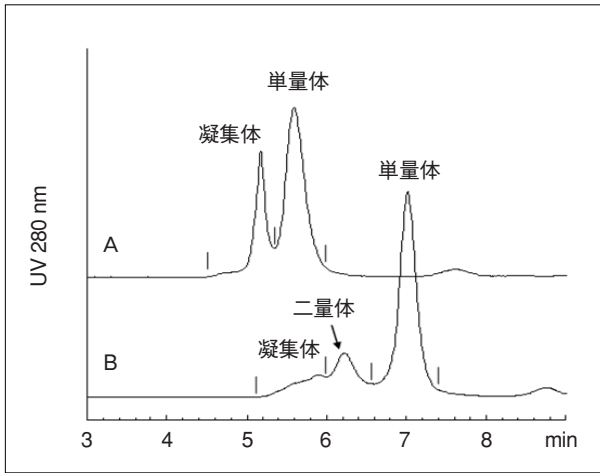


図2：チログロブリンのクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm
 溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL
 試料：チログロブリン (2.0 g/L)

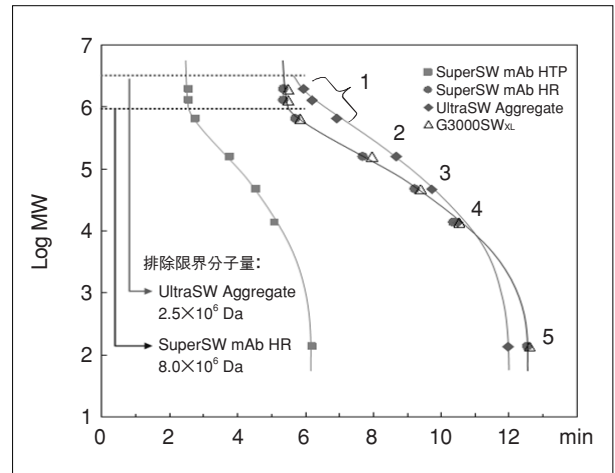


図3：較正曲線

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel UltraSW Aggregate
 B. TSKgel SuperSW mAb HR
 C. TSKgel G3000SWXL
 D. TSKgel SuperSW mAb HTP
 カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm (A, B, C)
 : 4.6 mm I.D.×15 cm (D)
 溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：1.0 mL/min (A, B, C), 0.35 mL/min (D)
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL (A, B, C), 5 μL (D)
 試料：1. チログロブリン三量体、二量体、単量体 (単量体MW 640,000)
 2. γ-グロブリン (MW 155,000)
 3. オブアルブミン (MW 47,000)
 4. リボヌクレアーゼ A (MW 13,700)
 5. p-アミノ安息香酸 (MW 137)

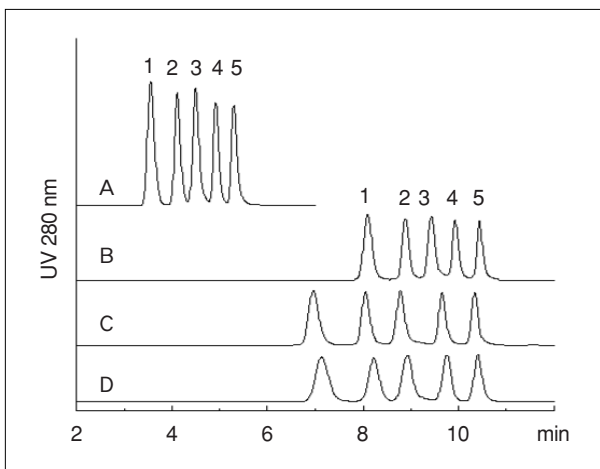


図4：市販タンパク質分子量マーカーのクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HTP
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 C. TSKgel SuperSW mAb HR
 D. TSKgel G3000SWXL
 カラムサイズ：4.6 mm I.D.×15 cm (A)
 : 7.8 mm I.D.×30 cm (B, C, D)
 溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：0.35 mL/min (A), 1.0 mL/min (B, C, D)
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：5 μL (A), 10 μL (B, C, D)
 試料：タンパク質分子量マーカー (オリエンタル酵母工業製)
 1. グルタミン酸脱水素酵素 (MW 290,000)
 2. 乳酸脱水素酵素 (MW 142,000)
 3. エノラーゼ (MW 67,000)
 4. ミオキナーゼ (MW 32,000)
 5. シトクロムc (MW 12,400)

表-3 各ピークの分離能 (Rs) の比較

カラム	分離度 Rs				
	1~2	2~3	3~4	4~5	平均
A. TSKgel SuperSW mAb HTP	2.24	1.68	1.95	1.83	1.93
B. TSKgel UltraSW Aggregate	2.68	2.01	1.95	2.17	2.20
C. TSKgel SuperSW mAb HR	3.03	2.29	2.93	2.58	2.71
D. TSKgel G3000SW _{XL}	2.37	1.72	2.22	2.00	2.08

2-3. 溶離液の塩濃度の影響

SECにおいては、充てん剤と測定物質間で生じる二次的相互作用（イオンの、疎水的相互作用や水素結合による相互作用）を抑制して測定を行う必要があります。シリカゲルを基材とするSWタイプの充てん剤では、充てん剤表面に残存するシラノール基とのイオンの相互作用（イオン排除効果、イオン交換）が生じることから、溶離液の塩濃度を最適化する事が重要となります。

図5、図6に50 mmol/Lリン酸緩衝液 (pH 6.7) を用い、硫酸ナトリウムの塩濃度を变化させた場合の標準タンパク質の溶出挙動を示します。溶離液のpHよりも等電点 (pI) の低い、チログロブリン (pI 4.5)、 γ -グロブリン (pI 5.1) およびオブアルブミン (pI 4.6) は、溶離液中で負に荷電しているため、低い塩濃度では残存シラノール基とのイオン排除効果により早く溶出します。一般に、イオン排除効果は、比較的低い塩濃度で抑制されること

から、溶離液中の硫酸ナトリウム濃度が100 mmol/L以上ではほぼ一定の溶出時間となります。

一方、溶離液のpHよりも等電点 (pI) の高いチトロムc (pI 10.1) およびリゾチーム (pI 11.2) は、溶離液中で正に荷電し残存シラノール基とのイオン交換的な相互作用により、低い塩濃度で充てん剤に吸着し、ピークがテーリングして溶出が遅くなります。溶離液の硫酸ナトリウム濃度が高くなるにしたがい、溶出が早くなり、150 mmol/L以上で良好なピーク形状を示し、ほぼ一定の溶出時間となります。ただし、タンパク質により、塩濃度を高くしすぎると、疎水的相互作用により溶出が遅れる場合があるため、緩衝液や塩の種類、濃度について最適な条件を選択する必要があります。溶離液組成の選択に関する詳細は、「セパレーションレポート No.18 “TSL-GEL SWタイプによるタンパク質の測定”」をご参照下さい。

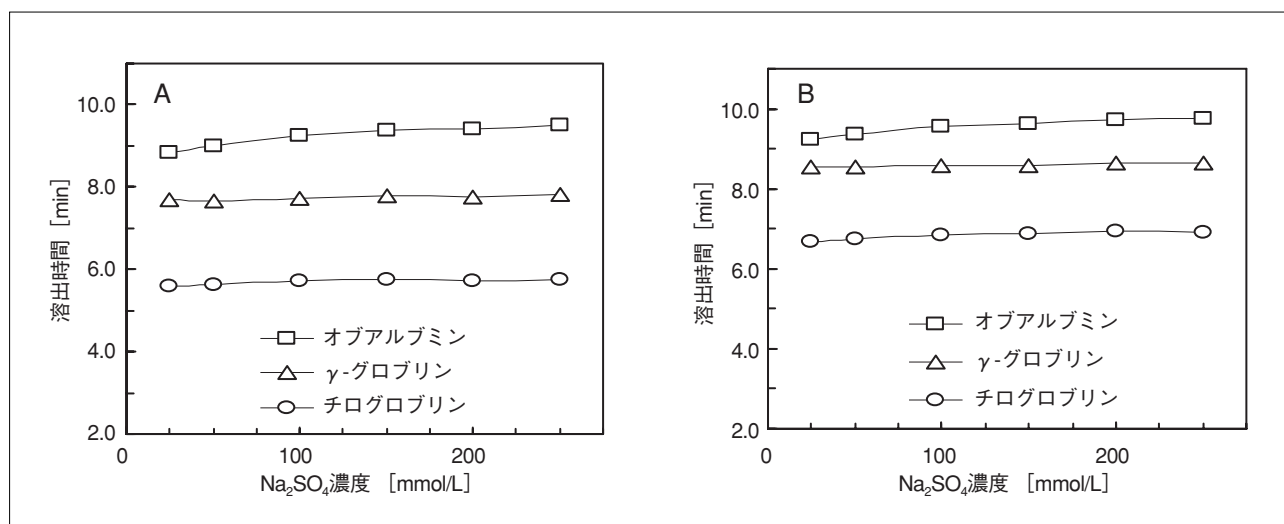


図5：塩濃度の溶出時間への影響（酸性タンパク質）

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 カラムサイズ：7.8 mm ID.×30 cm
 溶離液：50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) +
 X mmol/L Na₂SO₄ + 0.05 % NaN₃
 流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μ L
 試料：チログロブリン (15 g/L)
 γ -グロブリン (15 g/L)
 オブアルブミン (15 g/L)

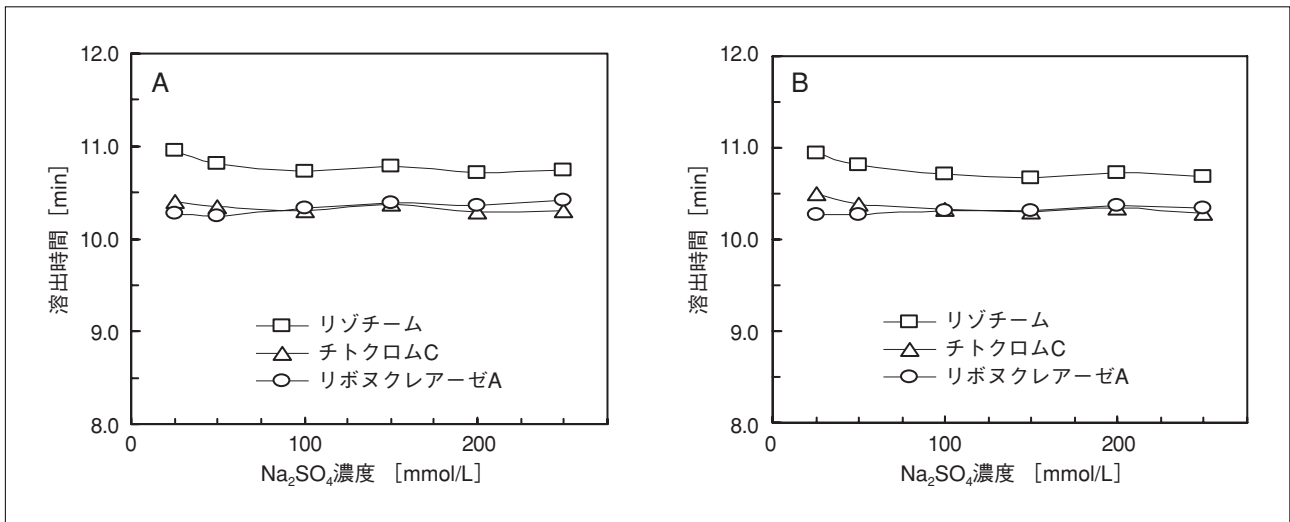


図6：塩濃度の溶出時間への影響（塩基性タンパク質）

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm
 溶離液：50 mmol/L リン酸緩衝液（pH 6.7）＋
 X mmol/L Na₂SO₄＋ 0.05 % NaN₃
 流 速：1.0 mL/min

検 出：UV 280 nm
 温 度：25 °C
 注入量：10 μL
 試 料：リボヌクレアーゼA（15 g/L）
 チトクロムC（15 g/L）
 リゾチーム（15 g/L）

2-4. 測定流速の影響

測定流速の理論段数への影響は、充てん剤の粒子径や測定物質の分子量（分子サイズ）等に依存することが知られています。異なる分子量の標準タンパク質および低分子物質を用いて、測定流速の理論段高さ（HETP）への影響を確認しました。

図7にTSKgel SuperSW mAb HRおよびTSKgel UltraSW Aggregateでの各タンパク質のvan Deemter曲線を示します。低分子物質のp-アミノ安息香酸は、線速度が遅くなると拡散による拡がりによりHETPが大きくなっています。しかしながら、分子量の大きいタンパク質では、線速度が遅いほどHETPが小さくなり、カラム効率が向上しています。線速度によるHETPへの影響は、分子量が大きいほど大きくなります。

また、TSKgel UltraSW Aggregateで線速度のHETPへの影響が小さい理由は、TSKgel SuperSW mAb HR

に比べ充てん剤の粒子径が小さいためと考えられます。

図8にTSKgel SuperSW mAb HRおよびTSKgel SuperSW mAb HTPでのIgG二量体と単量体の分離能の流速依存性について示します。測定流速を遅くすることにより、カラム効率が向上することから、IgG二量体と単量体の分離能も高くなっています。

また、図9にTSKgel UltraSW AggregateによるIgG凝集体分離の流速依存性を示しますが、分子量（分子サイズ）の大きい凝集体においても、低い流速で測定することによりカラム効率が向上し、分離能が高くなっています。図10に示すように、流速を1.0 mL/minから0.2 mL/minに下げて測定することにより、IgG凝集体の五量体まで分離されています。但し、測定流速を低くして測定した場合、配管等での拡がりによりカラム効率が低下することがありますので注意が必要です。

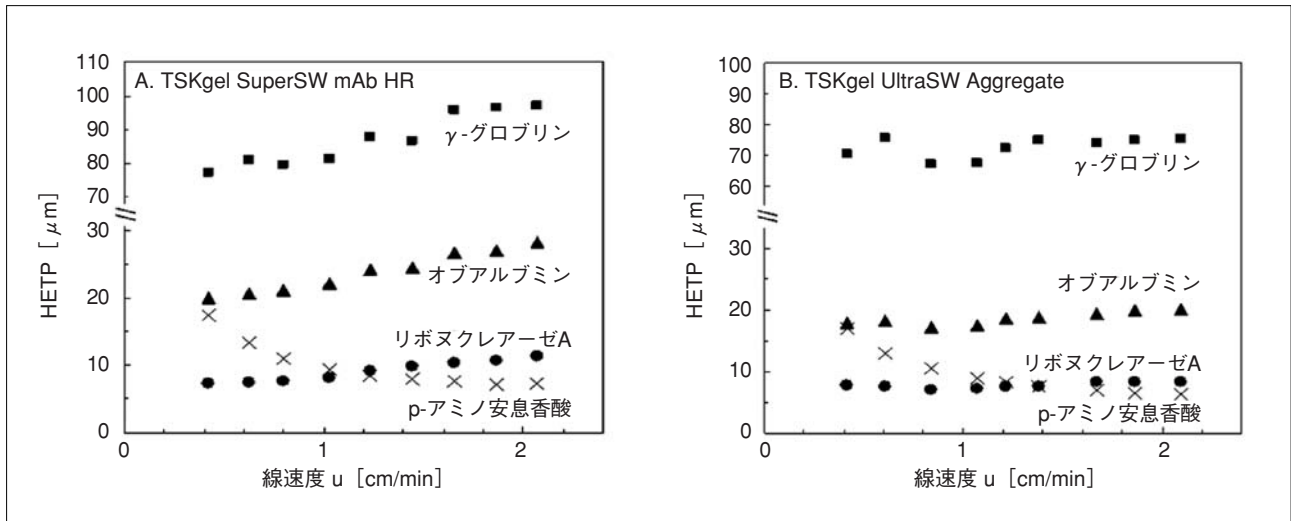


図7：流速の影響（1）タンパク質のvan Deemter曲線

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm
 溶離液：200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C

注入量：10 μL
 試料：γ-グロブリン (MW 155,000) (1.0 g/L)
 オブアルブミン (MW 47,000) (1.0 g/L)
 リボヌクレアーゼA (MW 13,700) (1.5 g/L)
 p-アミノ安息香酸 (MW 137) (0.01 g/L)

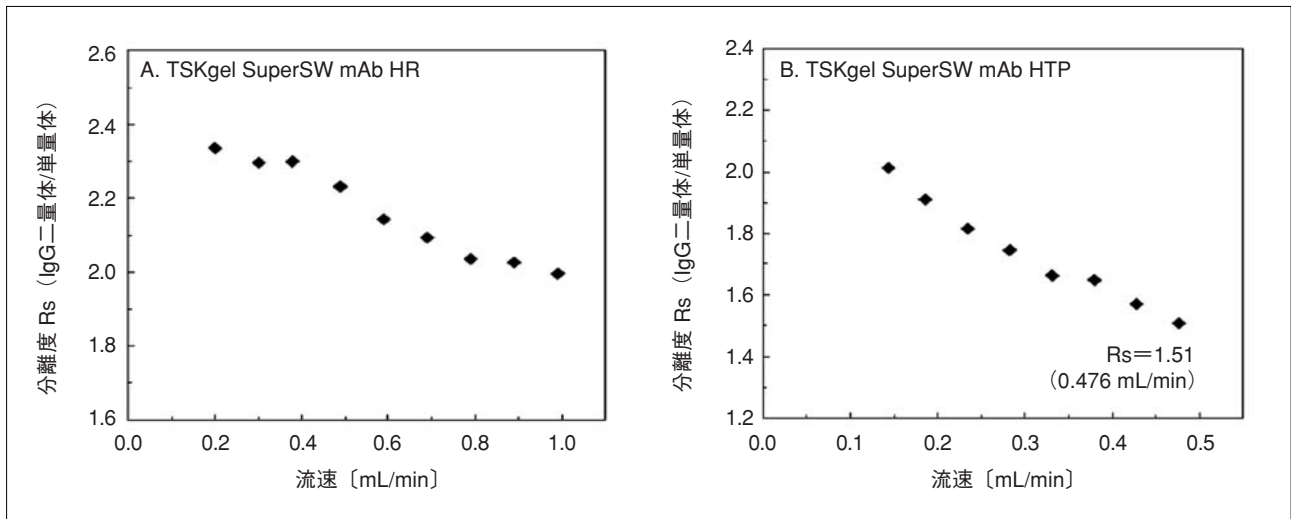


図8：流速の影響（2）IgG二量体・単量体間の分離度Rsの流速依存性

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel SuperSW mAb HTP
 カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm (A)
 : 4.6 mm I.D.×15 cm (B)
 溶離液：200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃

検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL (A), 5 μL (B)
 試料：筋注用免疫グロブリン (IgG) 製剤 (1.5 g/L)

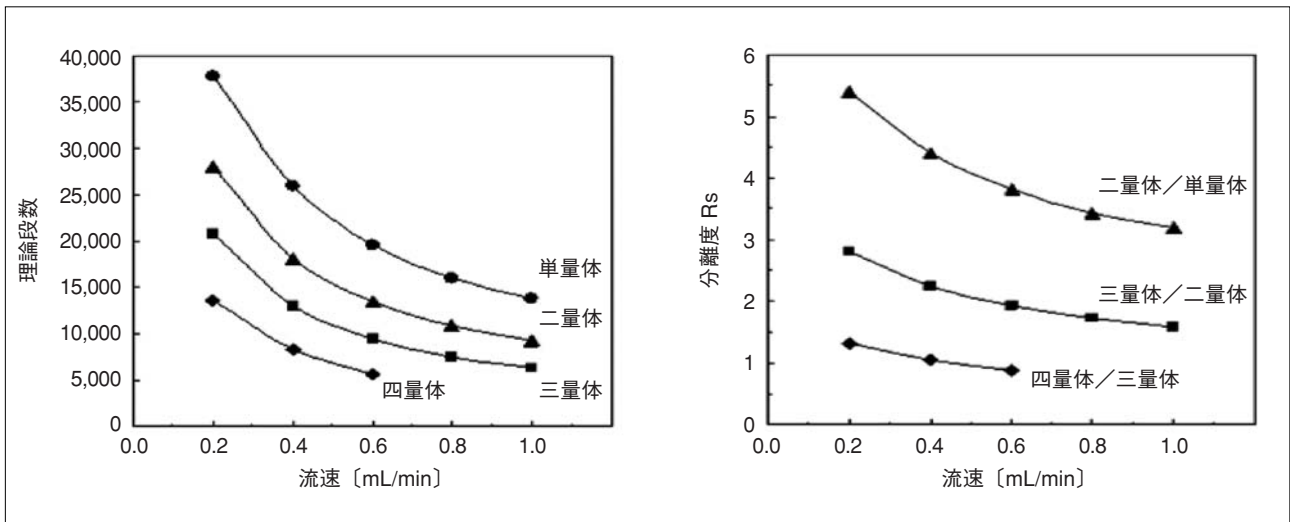


図9：流速の影響 (3) IgG凝集体の分離の流速依存性

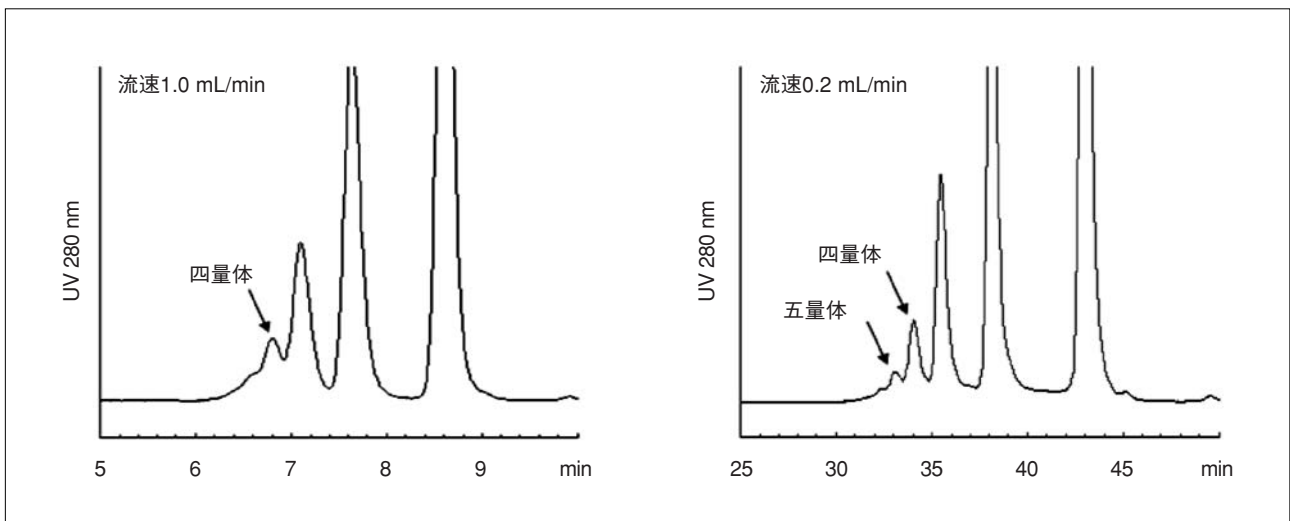


図10：流速の影響 (4) IgG凝集体の分離の流速依存性 (クロマトグラム)

<測定条件>

カラム：TSKgel UltraSW Aggregate
 カラムサイズ：7.8 mm ID.×30 cm
 溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：1.0, 0.2 mL/min

検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL
 試料：モノクローナル抗体 (ヒト) (5 g/L)

2-5. 市販SECカラムとの比較

IgG二量体と単量体の分離について市販SECカラムとの比較を行いました。図11にクロマトグラムの比較を示します。TSKgel SuperSW mAb HRは、IgG二量体と

単量体の分離能において最も高い分離能を示しました。また、ハイスループット用のTSKgel SuperSW HTPは、他社5 μmのSECカラムの1/2の測定時間で同等の分離能が得られています。

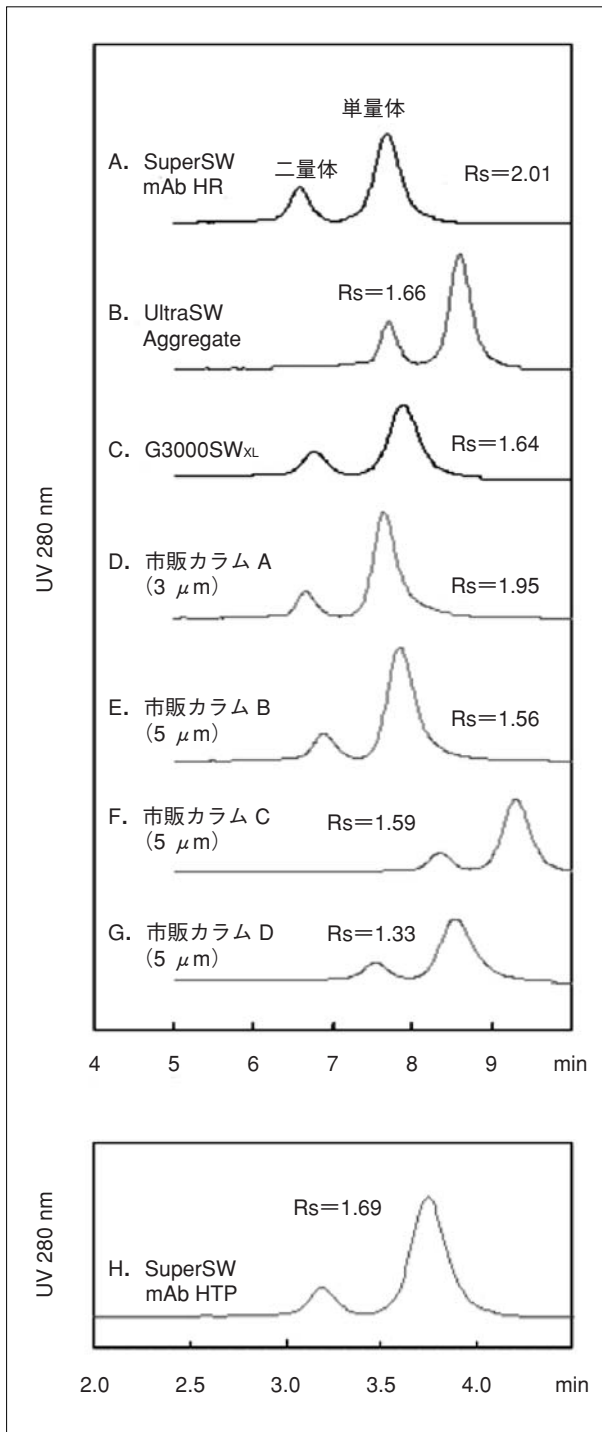


図11：IgGのクロマトグラムの比較

2-6. 耐久性

TSKgel SuperSW mAb HRおよびTSKgel UltraSW Aggregateでタンパク質を15分間隔で繰り返し注入した場合の耐久性について低分子化合物のp-アミノ安息香酸の溶出挙動により確認しました。図12、図13にTSKgel

〈測定条件〉

- カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 C. TSKgel G3000SW_{XL}
 D. 市販シリカ系SECカラム A (3 μm)
 E. 市販シリカ系SECカラム B (5 μm)
 F. 市販シリカ系SECカラム C (5 μm)
 G. 市販シリカ系SECカラム D (5 μm)
 H. TSKgel SuperSW mAb HTP

カラムサイズ：7.8 mm ID.×30 cm (A~E)
 : 8.0 mm ID.×30 cm (F, G)
 : 4.6 mm ID.×15 cm (H)

溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃

流速：1.0 mL/min (A~G), 0.35 mL/min (H)

検出：UV 280 nm

温度：25℃

注入量：10 μL (A~G), 3.5 μL (H)

試料：筋注用免疫グロブリン (IgG) 製剤
 (1.0 g/L ; A~G, 4.5 g/L ; H)

SuperSW mAb HRとTSKgel UltraSW Aggregateについて、p-アミノ安息香酸の溶出容量および理論段数維持率を示します。両カラムとも耐久性を確認したカラム3本でタンパク質を500回注入後も維持率の低下は5 %以下であり、良好な耐久性を示しています。

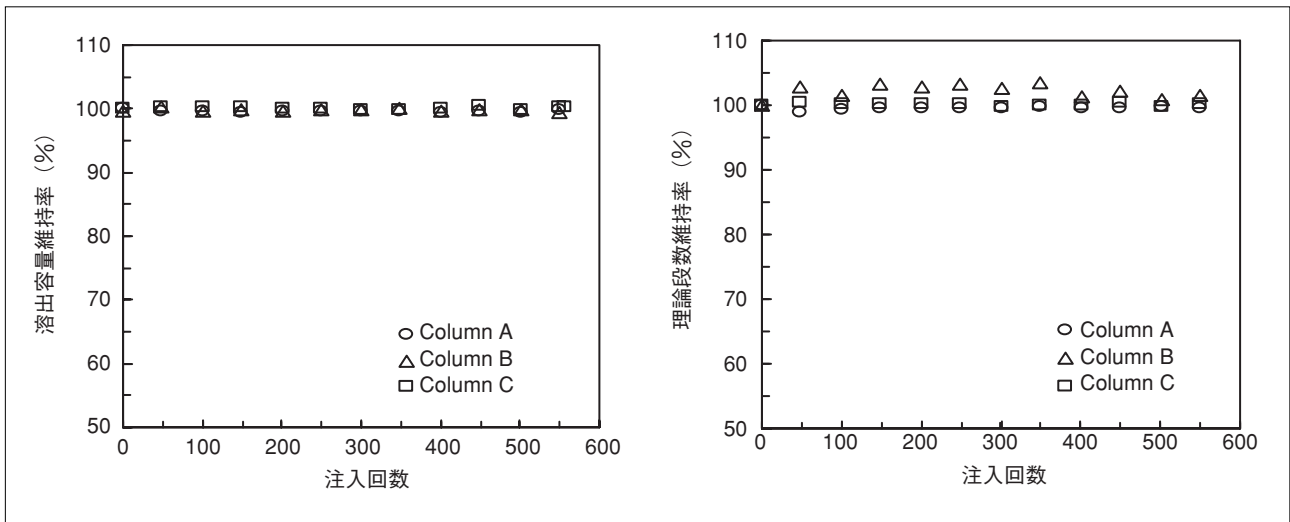


図12 注入耐久性 (TSKgel SuperSW mAb HR)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SuperSW mAb HR
 カラムサイズ：7.8 mmID.×30 cm
 溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL
 注入間隔：15 min (試料 ①→②→③→④)

試料：①チログロブリン(1.5 g/L), γ-グロブリン(1.5 g/L), オブアルブミン(1.5 g/L), リボヌクレアーゼA(1.5 g/L), p-アミノ安息香酸(10 mg/L)
 ②チログロブリン(1.5 g/L), β-ラクトグロブリン(1.5 g/L), DNP-L-アラニン(20 mg/L)
 ③γ-グロブリン(1.5 g/L), チトクロムC(1.5 g/L), DNP-L-アラニン(20 mg/L)
 ④ウシ血清アルブミン(1.5 g/L), リゾチーム(1.5 g/L), DNP-L-アラニン(20 mg/L)

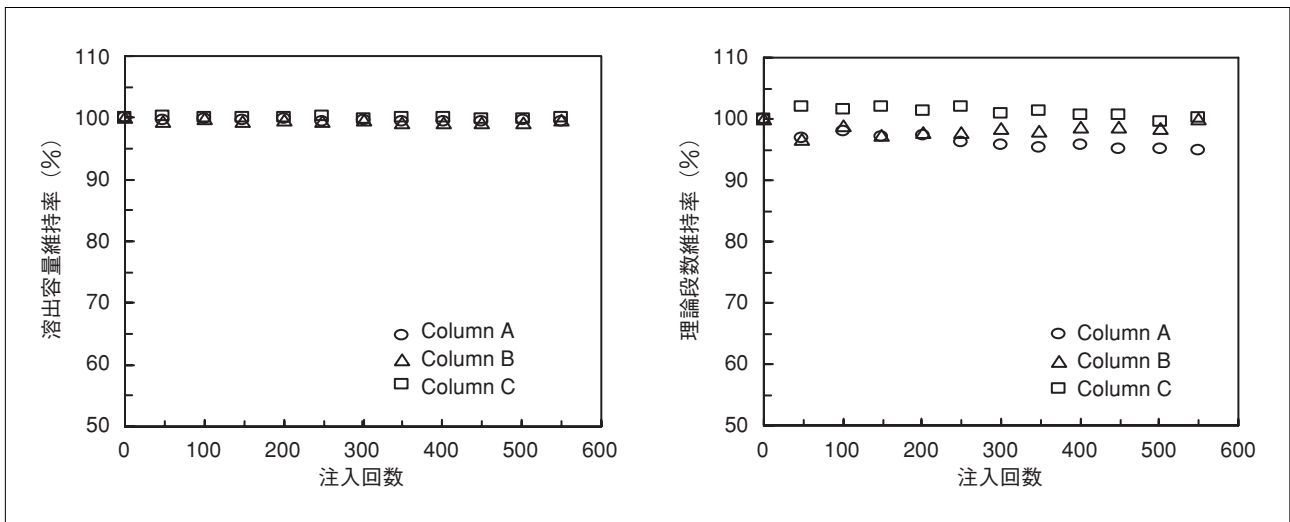


図13：注入耐久性 (TSKgel UltraSW Aggregate)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UltraSW Aggregate
 カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm
 溶離液：200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL
 注入間隔：15 min (試料 ①→②→③→④)

試料：①チログロブリン(1.5 g/L), γ-グロブリン(1.5 g/L), オブアルブミン(1.5 g/L), リボヌクレアーゼA(1.5 g/L), p-アミノ安息香酸(10 mg/L)
 ②チログロブリン(1.5 g/L), β-ラクトグロブリン(1.5 g/L), DNP-L-アラニン(20 mg/L)
 ③γ-グロブリン(1.5 g/L), チトクロムC(1.5 g/L), DNP-L-アラニン(20 mg/L)
 ④ウシ血清アルブミン(1.5 g/L), リゾチーム(1.5 g/L), DNP-L-アラニン(20 mg/L)

3. 分離例

3-1. パパイン消化IgGの分離

IgGをパパインで消化した過程をSECで観察しました。TSKgel SuperSW mAb HTP, TSKgel SuperSW mAb HR, TSKgel UltraSW AggregateおよびTSKgel G3000SW_{XL}を用いて測定したクロマトグラムを図14に示します。分解物としては、F(ab')₂、FabおよびFcが溶出していますが、本試料では、FabとFcは同じ位置に

溶出しています。各カラムともIgGの二量体および単量体は、消化時間とともにピークが小さくなっていきます。一方、分解物のピークは大きくなっていきます。表-4に示すように、分解物の分離においては、TSKgel SuperSW mAb HRで最も良好な分離が得られ、TSKgel SuperSW mAb HTPでは、1/2の測定時間で既存のTSKgel G3000SW_{XL}と同等の分離が得られています。

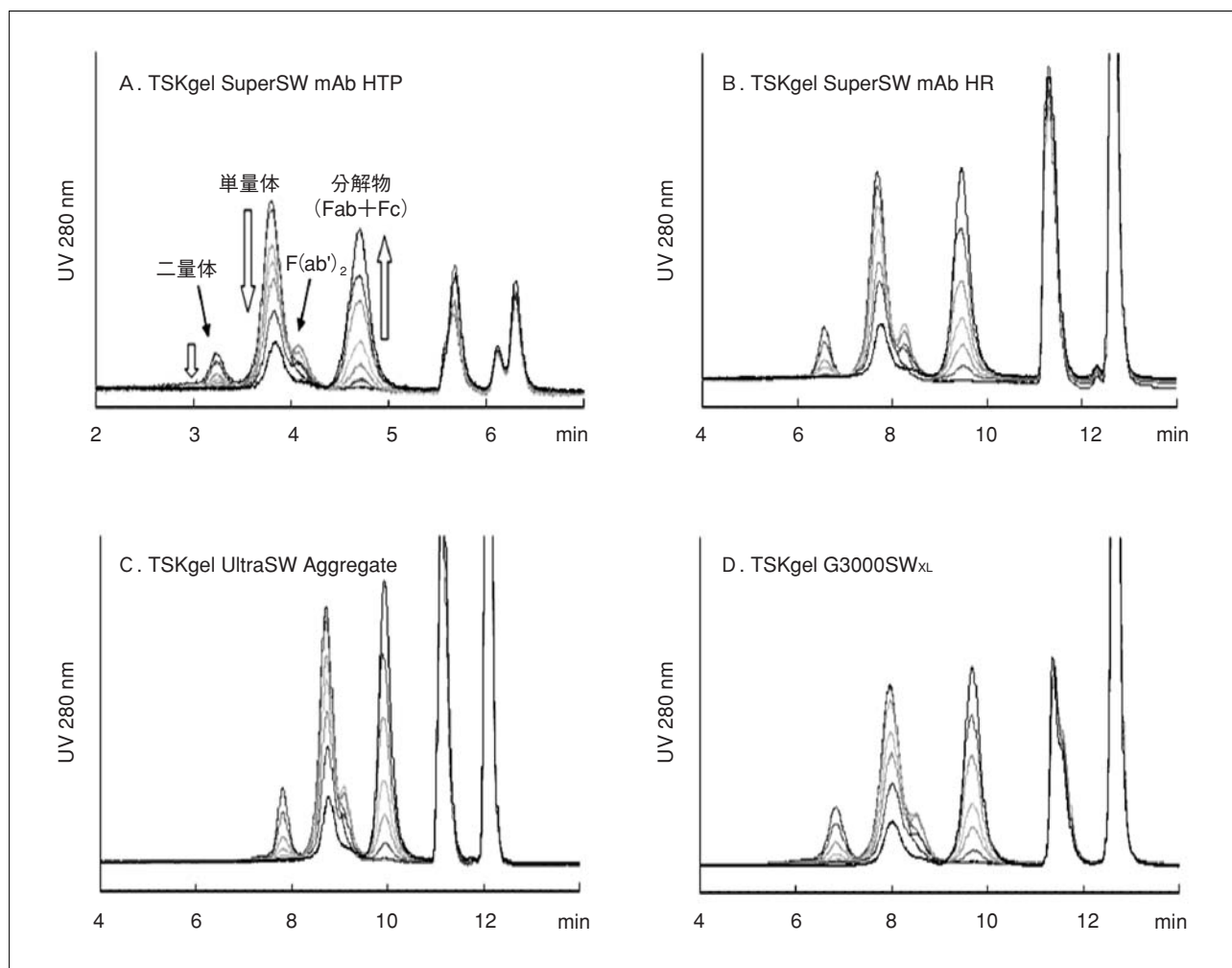


図14：パパイン消化IgGの分離

表-4 パパイン消化IgGの分離

カラム	未消化 IgG				パパイン消化IgG (消化時間1,440 min)	
	溶出時間 [min] (単量体)	理論段数 (二量体)	理論段数 (単量体)	分離度Rs (二量体/ 単量体)	理論段数 (分解物)	分離度Rs (単量体/ 分解物)
A. TSKgel SuperSW mAb HTP (4.6 mm I.D.×15 cm)	3.798	2,005	1,909	1.78	2,489	2.46
B. TSKgel SuperSW mAb HR (7.8 mm I.D.×30 cm)	7.683	2,895	2,320	2.02	3,826	2.87
C. TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mm I.D.×30 cm)	8.710	5,563	4,279	1.90	7,807	2.49
D. TSKgel G3000SW _{XL} (7.8 mm I.D.×30 cm)	7.963	1,912	1,781	1.63	3,883	2.50

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel SuperSW mAb HTP
 B. TSKgel SuperSW mAb HR
 C. TSKgel UltraSW Aggregate
 D. TSKgel G3000SW_{XL}

カラムサイズ：4.6 mm I.D.×15 cm (A)
 : 7.8 mm I.D.×30 cm (B, C, D)

溶離液：200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：0.35 mL/min (A), 1.0 mL/min (B, C, D)
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：5 μL (A), 10 μL (B, C, D)
 試料：パパイン消化IgG (10 g/L)
 (消化時間 0, 5, 15, 30, 60, 120, 1440 min)

3-2. 抗体医薬品の高速分析

TSKgel SuperSW mAb HTPを用いてモノクローナル抗体医薬品の高速分析を行いました。図15に示すように最大使用流速の0.5 mL/minで測定することによりIgGの単量体を3.5分の短時間で測定することが可能です。また、測定流速が速く、通常使用される流速0.35 mL/minに比べ、IgG二量体と単量体の分離能が低下していますが、分析に十分な分離が得られています。

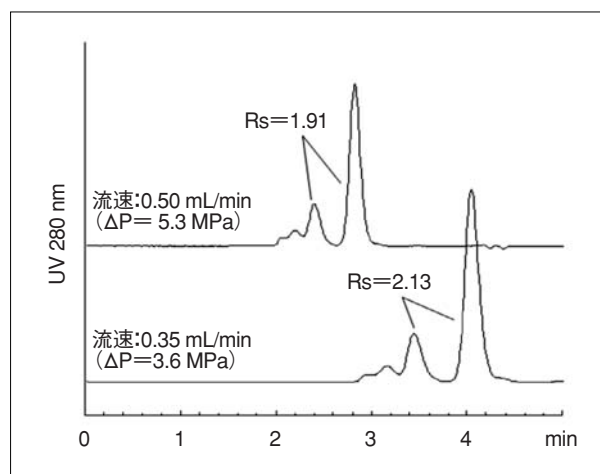


図15：抗体医薬の高速分析

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SuperSW mAb HTP
 カラムサイズ：4.6 mm I.D.×15 cm
 溶離液：200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
 流速：0.50, 0.35 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：5 μL
 試料：モノクローナル抗体医薬品 (マウスーヒトキメラ型) (10 g/L)

3-3. 抗体医薬品の精密分析

TSKgel G3000SW_{XL}、TSKgel SuperSW mAb HRおよびTSKgel UltraSW Aggregateを用いてモノクローナル抗体医薬品の精密分析を行いました。クロマトグラムの比較を図16に示します。TSKgel G3000SW_{XL}を用いたクロマトグラム (A) では、単量体、二量体、三量体が溶出し、凝集体の一部が排除されV₀に溶出しています。また、単量体ピークの後端に僅かな肩として分解物が溶出しています。TSKgel SuperSW mAb HRでのクロマトグラム (B) では、凝集体の一部はTSKgel G3000SW_{XL}同様に排除されV₀に溶出していますが、単量体、二量体、三量体の分離が向上し、単量体ピークの拡大図で示されているように、分解物がピークとして認識されています。TSKgel UltraSW Aggregateのクロマトグラム (C) では、四量体以上の凝集体の測定も可能です。このように、測定対象物の分子量により、カラムを選択することで凝集体や二量体、単量体および分解物の精密分析を行うことが可能です。

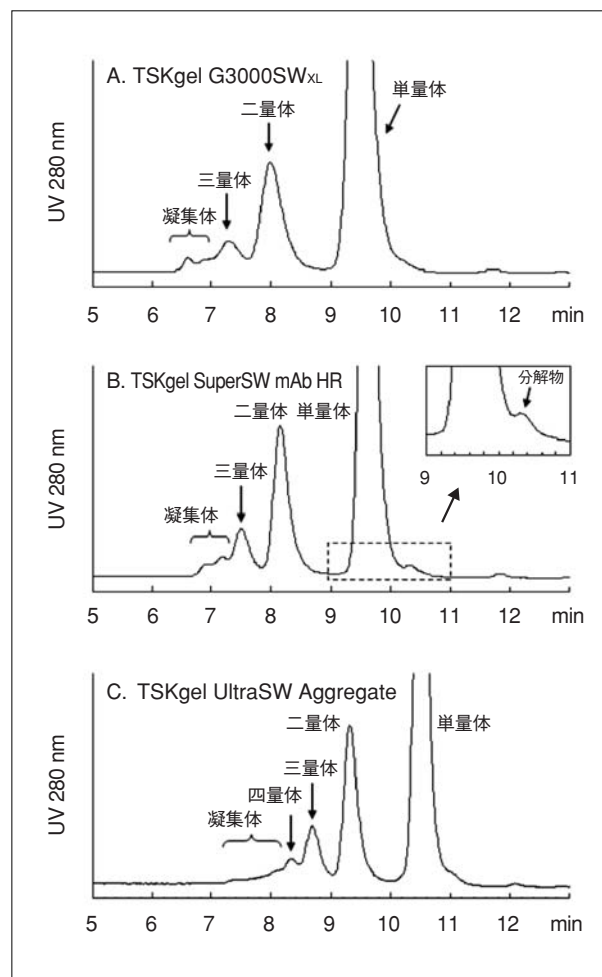


図16：抗体医薬の精密分析

〈測定条件〉

カラム：A. TSKgel G3000SW_{XL}

B. TSKgel SuperSW mAb HR

C. TSKgel UltraSW Aggregate

カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm

溶離液：200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃

流速：0.8 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：モノクローナル抗体医薬（マウスーヒトキメラ型）(10 g/L)

3-4. 抗体の熱処理生成凝集体の分析

TSKgel SuperSW mAb HRおよびTSKgel UltraSW Aggregateを用いて、モノクローナル抗体を熱変性して生成する凝集体の測定を行いました。クロマトグラムを図17に示します。TSKgel SuperSW mAb HRでは、熱変性により生成した凝集体がV₀に溶出するために、生成した凝集体の分子量（分子サイズ）に関する情報を得る

ことができません。しかしながら、細孔径の大きいTSKgel UltraSW Aggregateでは、生成した凝集体が十分に細孔内に浸透してサイズ排除により溶出しています。TSKgel UltraSW Aggregateのクロマトグラムに示されるように、熱処理時間が長くなるとともに、分子量（分子サイズ）が大きい凝集体が増加していることがわかります。

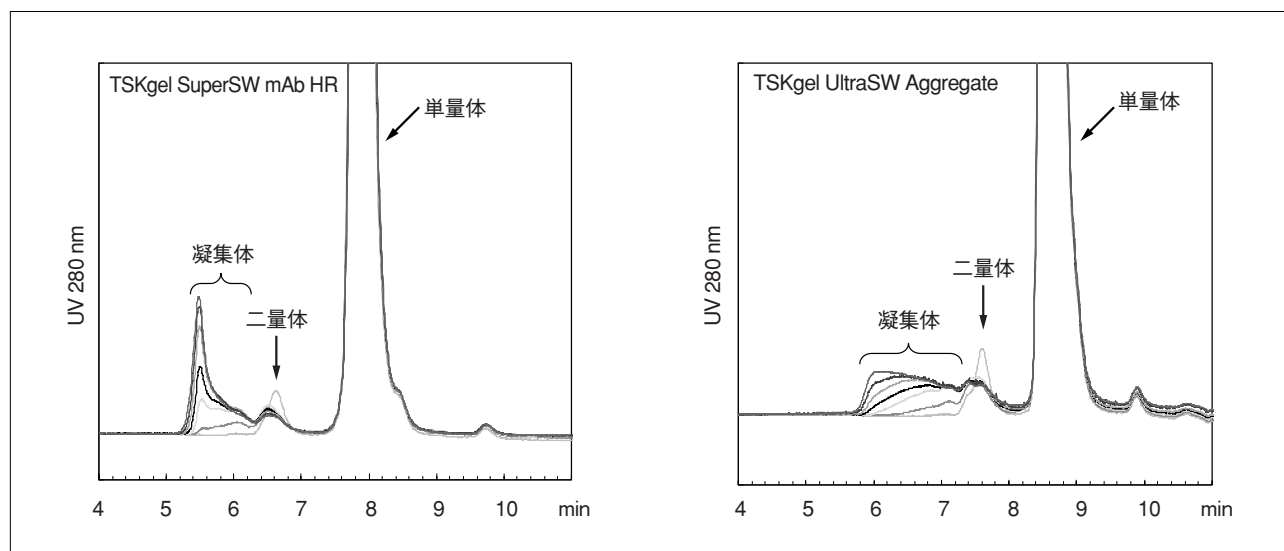


図17：抗体の熱処理によって生成した凝集体の分析

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SuperSW mAb HR
TSKgel UltraSW Aggregate
カラムサイズ：7.8 mm I.D.×30 cm
溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液(pH 6.7) + 0.05 % NaN₃
流速：1.0 mL/min
検出：UV 280 nm

温度：25 ℃
注入量：10 μL
試料：モノクローナル抗体（ヒト）(25 g/L),
60 ℃で5~90 min加熱処理

4. おわりに

以上、TSKgel SuperSW mAb HR、TSKgel SuperSW mAb HTPおよびTSKgel UltraSW Aggregateについて概説しました。これらのカラムを使用することで、抗体の二量体や単量体だけでなく、抗体医薬品の製造工

程や保管中に生じることのある凝集体や分解物等の不純物の精密分析やハイスループット分析を行うことが可能です。

※ “TSKgel” は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
山口営業所 ☎(0834) 63-9888 〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>